Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 2, June. July. 2018, p. 273- 282

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 2، خرداد- تیر 1397 ص. 282-273

فعالیت ضدباکتریایی و آنالیز فیزیکوشیمیایی چند نوع عسل با منشاء گیاهی مختلف در استان گلستان

سمانه هیزمی شیره‌جینی[1] - هادی کوهساری[2]* - سیده زهرا سیدالنگی[3]

تاریخ دریافت: 1395/09/20
تاریخ پذیرش: 1396/02/30

چکیده

عسل به‌عنوان یک ماده غذایی مهم با منشاء طبیعی، پتانسیل بالایی برای فعالیت ضدمیکروبی دارد. منشاء گیاهی عسل در ویژگی‌های بیولوژیکی آن بسیار موثر می‌باشد. لذا این تحقیق به‌منظور بررسی فعالیت ضدباکتریایی و آنالیز فیزیکوشیمیایی چهار نوع عسل شامل آویشن، زول، پونه و شوید جمع‌آوری شده از کندوهای زنبور عسل در استان گلستان انجام شد. ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی علیه چهار باکتری شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *شیگلا دیسانتری* بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک انجام شد. کمترین غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت باکتری‌کشی نمونه‌های عسل به وسیله روش ماکرودایلوشن تعیین شد. همچنین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی شامل رطوبت، pH، اسیدیته، محتوای خاکستر و قندهای احیاءکننده برای نمونه‌های عسل، مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاکی از بیشترین فعالیت ضدباکتریایی برای عسل زول به‌ترتیب با قطر هاله عدم رشد 15/5، 14و 11 میلی‌متر علیه *شیگلا دیسانتری*، *استافیلوکوکوس اورئوس* ، *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا کلی* در غلظت 50 درصد حجمی/ حجمی می باشد. سطوح MIC وMBC به‌دست آمده برای عسل‌های مورد آزمون در محدوده 50 -6/25 درصد حجمی/ حجمی بوده و عسل پونه کمترین فعالیت ضدباکتریایی را نشان داد. به‌طور کلی نتایج این تحقیق دلالت بر این دارد که فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های عسل با توجه به منشاء گل عسل متغیر است.

واژه‌های کلیدی: عسل، فعالیت ضدباکتریایی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، منشاءگیاهی

مقدمه

گرایش روزافزون به محصولات طبیعی با کارکردهای درمانی، استفاده از عسل به‌عنوان یک محصول طبیعی که ویژگی‌های بیولوژیک متعدد را به آن نسبت می‌دهند را مطرح می‌سازد. عسل توسط زنبور عسل از شهد گل‌ها جمع‌آوری می‌شود و پس از فرآوری و تبخیر رطوبت اضافی، در کندو ذخیره می شود. مهمترین ماده تشکیل‌دهنده عسل کربوهیدرات می‌باشد و قندهای فروکتوز و گلوکز حدود 95-85 درصد کربوهیدرات‌های عسل را تشکیل می‌دهند. علاوه بر این، سایر قندها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی، فلاونوئید ها، اسیدهای فنلی، آنزیم‌ها و ترکیبات فرار، دیگر ترکیبات موجود در عسل را تشکیل می‌دهند که خواص عسل به آنها بر می‌گردد (Guerrini *et al*.,2002، استاندارد شماره 92 سازمان استاندارد ملی ایران; لکزاده و همکاران، 1392).

ویژگی‌های بیولوژیک عسل از جمله فعالیت ضدمیکروبی، ضدتوموری، ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضدویروسی آن به گروهی از ترکیبات ذاتی این ماده غذایی مربوط می‌شود که به منشاء گیاهی، جغرافیایی و حشره‌شناسی عسل مربوط می‌شود (Fidaleo *et al*., 2011; Tumin *et al*., 2005; Mollan, 2002).

فاکتورهای متعددی در فعالیت ضدباکتریایی عسل دخیلند. از آن جمله می‌توانیم به اسیدیته، اسمولاریته، پراکسیدهیدروژن (این ماده محصول تجزیه گلوکز به‌وسیله آنزیم گلوکز اکسیداز است)، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی اشاره کنیم. همچنین مقادیر کمی از آنزیم‌های گلوکز اکسیداز، پروتئاز، آمیلاز، کاتالاز و فسفاتاز و وجود ترکیبات شیمیایی همچون متیل گلیوکسال نیز تاثیرگذار می‌باشند (Amara, 2008; Mavric *et al*., 2008; Moussa *et al*., 2011; Paulus

1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم وصنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.
2- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.
3- دانشیار، گروه شیمی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.
(*مسئول مکاتبات: Email: hadikoohsari@yahoo.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v0i0.60915

(Odd *et al*., 1990; Boukraa &*et al*., 2012).

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی و آنالیز فیزیکوشیمیایی چند نوع عسل با منشا گیاهی مختلف جمع‌آوری شده از کندوهای زنبور عسل در استان گلستان است.

مواد و روش‌ها

4 نمونه عسل با منشاء گیاهی متفاوت شامل آویشن، شوید، زول و پونه در بهمن ماه 1393 از کندوهای زنبور عسل در استان گلستان واقع در شمال ایران جمع‌آوری شدند و تا زمان آزمایش در دمای یخچال و دور از نور و رطوبت نگهداری شدند.

سویه‌های باکتریایی

سویه‌های باکتری‌های مورد آزمون شامل دوگونه باکتری گرم منفی یعنی *اشریشیا کلی* (PTCC 1338)، *شیگلا دیسانتری* (PTCC 1188) و دوگونه باکتری گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) و *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1154) به‌صورت لیوفیلیزه ازسازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر در محیط BHI و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد احیاء شدند. آزمون‌های میکروبی بر اساس انتشار در آگار و به روش چاهک انجام شد. همچنین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری‌کشی (MBC) هر یک از نمونه‌های عسل به روش ماکرودایلوشن مورد آزمون قرار گرفت.

تهیه محلول استاندارد 0/5 مک‌فارلند

یکی از روش‌های تعیین تعداد باکتری‌ها در محیط مایع، روش شمارش غیرمستقیم است. در روش کدورت‌سنجی که یکی از معمولی‌ترین روش‌های شمارش غیرمستقیم است، کدورت محیط مایع که باکتری در آن رشد کرده است با یک استاندارد که کدورت آن با تعداد معینی باکتری متناسب است، مقایسه می‌شود. کدورت استاندارد را می‌توان به‌وسیله مخلوط کردن مقادیر مشخصی از مواد شیمیایی ایجاد نمود که یک نمونه از آن سولفات باریوم است که شدت آن توسط مک فارلند با تعداد تقریبی باکتری‌ها ارزیابی شده است.

استانداردهای مک فارلند با افزودن حجم خاصی از محلول اسید سولفوریک 1% و کلرید باریوم 1/175% برای به‌دست آوردن یک محلول سولفات باریوم با دانسیته نوری خاص تهیه می‌شوند و معمولا استاندارد 0/5 مک فارلند که از افزودن 9/95 میلی‌لیتر اسید سولفوریک خالص 1% حجم به حجم (0/036 نرمال) به 0/05 میلی‌لیتر کلرید باریوم 1/175% (0/048 مولار) با دانسیته نوری 0/08 تا 0/13 در طول موج 625 نانومتر، حاصل می‌شود بیشتر کاربرد دارد. استاندارد 0/5 مک فارلند کدورتی معادل با یک سوسپانسیون باکتریایی معادل $1/5\times10^8$ cfu/ml ایجاد می‌کند. (Franklin *et al*., 2012).

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی به روش چاهک

اثر ضدباکتریایی بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور رقت‌های 100، 75، 50، 30، 25، 12/5درصد (حجمی/ حجمی) از هر یک از عسل ها در آب دوبار تقطیر استریل تهیه شد. ازسوسپانسیون معادل 0/5 مک فارلند ($1/5\times10^8$ cfu/ml) باکتری‌های پاتوژن با سواپ استریل در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به‌طور یکنواخت کشت داده شد. سپس با کمک پیپت پاستور استریل چاهک هایی به قطر8/2 میلی‌متر در محیط حفرشد و از هر یک از رقت‌های عسل‌های مورد آزمون 100 میکرولیتر در چاهک‌ها ریخته و به مدت24 تا 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از این مدت با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد آزمون تعیین شد (Hegazi *et al*., 2014) .

تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری‌کشی (MBC)

تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی هر یک از نمونه‌های عسل بر اساس کدورت‌سنجی و با استفاده از روش ماکرودایلوشن انجام شد. به این منظور رقت‌های مختلف نمونه‌های عسل که در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شده‌اند در مجاورت سوسپانسیون میکروبی معادل 5×10^5 CFU/ml از هریک از باکتری‌های پاتوژن مورد آزمون به مدت 24 ساعت و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در کنار این لوله‌ها لوله کنترل مثبت (سوسپانسیون باکتری معادل 5 ×105CFU/ml) و لوله کنترل منفی (مولر هینتون براث بدون باکتری) نیز قرار داده شد. پس از این مدت نتایج به‌صورت کدورت میکروبی قابل مشاهده و ثبت گردید. آخرین رقتی که در آن کدورت میکروبی مشاهده نشد به‌عنوان کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین شد. به‌منظور تعیین کمترین غلظت باکتری‌کشی (MBC) از هر یک از لوله فوق در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و آخرین رقتی که در آن کلنی مشاهده نشد به‌عنوان کمترین غلظت باکتری‌کشی تعیین شد (Franklin *et al*., 2012).

خصوصیات فیزیکوشیمیایی

خواص فیزیکوشیمیایی عسل بر اساس معیارهای کیفی عسل که در راهنما و دستورالعمل اروپا (European Directive) و کمیسیون

مواد غذایی کدکس (Codex Alimentarius Commision) تعیین شده است، صورت می‌گیرد. معمولا استاندارد کدکس برای تجارت عسل در کل دنیا معتبر است. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مورد مطالعه شامل رطوبت، pH، اسیدیته، محتوای خاکستر و قندهای احیاءکننده بود.

اندازه‌گیری رطوبت

برای این منظور از دستگاه رفراکتومتر در حرارت 20 درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. یک قطره عسل بر روی رفراکتومتر قرار داده شد. سپس با استفاده از جدول مرجع از روی اندیکس رفراکسیون به‌دست آمده درصد رطوبت عسل محاسبه شد (استاندارد ایران، شماره 92).

اندازه‌گیری pH

حدود 10 گرم عسل در 75 میلی‌لیتر آب مقطر بدون گاز دی‌اکسیدکربن حل شد و با استفاده از pHمتر کالیبره شده در بافر 4و 7 در 20 درجه سانتی‌گراد pH نمونه عسل ثبت شد (استاندارد ایران، شماره 92).

اندازه‌گیری اسیدیته آزاد

حدود 10 گرم عسل در 75 میلی‌لیتر آب مقطر بدون گاز دی‌اکسیدکربن حل شد. محلول به‌دست آمده در مجاورت شناساگر فنل فتالئین، تا رسیدن به pH (8/3) و ایجاد رنگ پوست پیازی با سود یک دهم نرمال تیتر گردید. آزمایش شاهد برای آب مقطر و شناساگر انجام شد. میزان اسیدیته آزاد بر حسب میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم (meq/kg) از حاصلضرب تفاوت سود مصرفی نمونه و شاهد در نرمالیته سود و عدد 1000، تقسیم بر وزن نمونه به گرم به‌دست آمد (استاندارد ایران، شماره 92).

اندازه‌گیری محتوای خاکستر

کروزه‌ها در کوره الکتریکی 500 درجه سلسیوس قرار داده شدند تا به وزن ثابت برسند. بعد از خنک شدن در دیسیکاتور، وزن آنها تعیین می‌شود. سپس 5 گرم عسل در داخل کروزه ریخته و به ملایمت حرارت داده می‌شود تا کف کردن آن تمام شده و کاملا سیاه شود و دیگر دودی از آن متصاعد نشود. این نمونه‌ها در کوره الکتریکی 500 تا 550 درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود تا کاملا تبدیل به خاکستر سفید رنگ گردد و به وزن ثابت برسد. تفاوت وزن کروزه خالی و بوته محتوی خاکستر را به وزن نمونه مورد آزمون تقسیم و در عدد 100 ضرب کرده تا درصد خاکستر (مواد معدنی) به‌دست آمد (استاندارد ایران، شماره 92).

اندازه‌گیری قندهای احیاء کننده

جهت تعیین قندهای احیاءکننده از روش لین‌آینون و مطابق استاندارد شماره 92 موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران استفادئه گردید (استاندارد شماره 92 سازمان استاندارد ملی ایران). به‌طور خلاصه 1 گرم نمونه عسل در یک بشر کوچک با آب مقطر حل شده و در یک بالن ژوژه 250 میلی‌لیتری به حجم رسانیده می‌شود و بورت 50 میلی‌لیتری را از آن پر می‌شود. 5 میلی‌لیتر محلول فهلینگ آ و 5 میلی‌لیتر محلول فهلینگ ب را در ارلن مایر 250 میلی‌لیتری ریخته و 15 میلی‌لیتر از محلول بورت به آن اضافه شده و تیتر می‌گردد. درصد قندهای احیاء کننده با توجه به فرمول زیر به دست می آید.

$$S = F\times250\times100/V\times W\times1000 \quad (1)$$

که در آن:

S= قندهای احیاءکننده در صد گرم نمونه عسل

F= عیار فهلینگ

V= میلی‌لیتر مصرف بورت

W= وزن نمونه عسل (1 گرم)

1000= تبدیل میلی‌گرم به گرم

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این پژوهش بر اساس طرح آزمایشی کاملا تصادفی و در سه تکرار انجام شد. آنالیز واریانس، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری (P<0/05) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های عسل

نتایج مربوط به ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نمونه های عسل با روش چاهک در جدول1 آمده است.

نتایج حاکی از اثرات ضدباکتریایی عسل‌های مورد آزمون بود و تفاوت بین انواع گیاهان مورد استفاده زنبورعسل در تولید محصول در خواص ضدباکتریایی آن موثر است. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی با روش چاهک برای عسل زول به‌ترتیب با قطر هاله عدم رشد 19/66، 14، 11و 11 میلی‌متر علیه *شیگلا دیسانتری، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشریشیا کلی* در غلظت 50 درصد حجمی/ حجمی گزارش شد. همچنین در این مطالعه تاثیرگذارترین نمونه عسل علیه باکتری‌های *شیگلا دیسانتری، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشریشیاکلی* به‌ترتیب *زول* با میانگین قطر هاله عدم رشد 19/66 میلی‌متر، *آویشن* با میانگین قطر هاله عدم رشد 18/66میلی‌متر، زول با میانگین قطر هاله عدم رشد 15 میلی‌متر

و زول با میانگین قطر هاله عدم رشد 13/66 میلی‌متر بودند (جدول1). و *شیگلا دیسانتری* حساس‌ترین باکتری و *اشرشیاکلی* مقاوم‌ترین باکتری مورد آزمون نسبت به نمونه‌های عسل در این تحقیق بودند (P<0/05).

نتایج به‌دست آمده از روش چاهک در حقیقت وابستگی معنی‌داری بین غلظت‌ها و قطرهاله عدم رشد را نشان داد که با افزایش غلظت، قطر هاله عدم رشد افزایش می‌یابد، که مشابه نتایج تحقیق Khairy و همکاران (2013) و Sherlock و همکاران (2012) بود.

مقاومت *اشریشیاکلی* به‌عنوان یک باکتری گرم منفی در مواجه با غلظت‌های مختلف عسل در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Sherlock *et al* 2010; Fidaleo *et al* 2011).

Khairy و همکاران (2013) نیز نشان دادند که *سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریتیدیس* در حضور عسل‌های شبدر و کوهستان حساس‌تر از *اشریشیاکلی* بودند. این مقاومت می‌تواند به دلیل نفوذپذیری کمتر غشای خارجی این باکتری به‌عنوان یک باکتری گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت باشد که ورود عوامل ضدمیکروبی را به داخل سلول باکتری محدود می‌کند (Nikaido, 2003).

با وجود اینکه *شیگلا دیسانتری و اشریشیا کلی هر دو گرم منفی و از خانواده انتروباکتریاسه می‌باشند ولی حساسیت قابل توجه شیگلا دیسانتری* نسبت به نمونه‌های عسل جالب توجه بود. این حساسیت در مطالعات مشابه به تفاوت‌های اختصاصی هر گونه میکروارگانیسم به فعالیت ضدباکتریایی عسل استفاده شده ارتباط داده شد (Nzeako& Hamdi, 2000; Ceyhan & Ugur, 2001; Taormina *et al*. 2001;Tumin *et al*., 2005).

جدول1- میانگین قطر هاله عدم رشد نمونه‌های عسل‌ها در روش چاهک

غلظت(درصد)	100				50				25			
عسل باکتری	شوید	آویشن	زول	پونه	شوید	آویشن	زول	پونه	شوید	آویشن	زول	پونه
شیگلا دیسانتری	18±1/52 ^{aA}	18±1/41 ^{aA}	19/66±1/41 ^{aA}	15±0 ^{bA}	13±0^{bB}	13±0 ^{bC}	15/5±0/7^{aB}	_	_	_	12±1/06^{C}	_
استافیلوکوکوس اورئوس	18±0/7 ^{aA}	18/66±0/7^{aA}	18±0 ^{aA}	13±0 ^{deA}	_	13/5±0/7^{bC}	14±0^{bC}	_	_	_	11±0 ^{aD}	_
باسیلوس سرئوس	12/66±0/57^{cde}	13/33±0/57^{bcd}	15±1/41 ^{bA}	13/5±1/06^{bc}	_	_	11±1/41 ^{cB}	_	_	_	_	_
اشریشیا کلی	11/33±0/57 ^{e}	12±0 ^{de}	13/66±0/57^{bcdA}	13/5±0/7^{bcd}	_	_	11±0 ^{cB}		_	_	_	

حروف مشترک در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.

حروف مشترک در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.

کمترین غلظت مهارکنندگی(MIC) و کمترین غلظت باکتری‌کشی (MBC) هر یک از نمونه‌های عسل با روش ماکرودایلوشن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این آزمون در جدول 2 آمده است. همانطور که مشاهده می‌شود کمترین غلظت مهارکنندگی عسل‌های مورد آزمون در محدوده 6/25 تا 50 حجمی/ حجمی درصد است.

فعالیت ضدباکتریایی عسل زول در مهار رشد باکتری‌های مورد آزمون قابل توجه بود به‌طوریکه کمترین غلظت مهارکنندگی آن برای *شیگلا دیسانتری، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشریشیاکلی* به‌ترتیب ٪6/25، 10%، 10% و 25% بود(جدول2).

حساسیت *شیگلا دیسانتری* و مقاومت *اشریشیا کلی* نسبت به عسل‌های مورد آزمون در این روش نیز به اثبات رسید به‌طوریکه کمترین غلظت مهارکنندگی عسل‌های *آویشن، شوید*، زول و پونه برای باکتری *شیگلا دیسانتری* به‌ترتیب 15%، 15%، 6,25% و 10% و برای باکتری *اشریشیا کلی* به‌ترتیب 25%، 30%، 25% و 50% بود (جدول2).

فعالیت ضدباکتریایی کم عسل پونه در این روش نیز به اثبات رسید به‌طوریکه کمترین غلظت مهارکنندگی این نمونه عسل برای باکتری‌های *اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و شیگلا دیسانتری* به‌ترتیب 50%، 25%، 12/5% و 10% بود (جدول2).

Fidaleo و همکاران (2011) در مطالعه فعالیت ضدمیکروبی هفت نمونه عسل ایتالیایی با منشاء گیاهی مختلف کمترین غلظت مهارکنندگی عسل‌های مورد آزمون را در محدوده20-5 درصد گزارش کردند. باکتری‌های گرم مثبت در مطالعه آنها نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نشان دادند.

Yavarpour و همکاران (2014) نیز کمترین غلظت مهاری 12/5درصد را برای عسل‌های گشنیز، خرمالو، یونجه و مرتعی کهگیلویه و بویراحمد و حداقل غلظت مهاری 25% را برای عسل گون گزانگبین گزارش کردند.

Sherlock و همکارانش (2010)، با مطالعه بر روی دو نمونه عسل و مقایسه اثرات ضدباکتریایی آنها با عسل ساخته شده در آزمایشگاه علیه *سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین* به این نتیجه رسیدند که سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در روش چاهک در مقایسه با *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* حساسیت بیشتری نسبت به

نمونه‌های عسل نشان دادند که با مطالعه حاضر مطابقت داشت. همچنین در مطالعه آنان کمترین غلظت مهارکنندگی برای سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین* در محدوده 3/12% تا 12/5% و برای *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* 12/5% بود که با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

Mullai و Menon (2007) کمترین غلظت مهارکنندگی انواع مختلف عسل علیه ایزوله‌های محیطی و کلینیکی *سودوموناس آئروژینوزا* در محدوده 20-10 درصد گزارش کردند.

به‌طور کلی نتایج نشان داد که با توجه به منشاء گیاهی مختلف نمونه‌های عسل فعالیت ضدباکتریایی مختلفی را نشان دادند. Al-Waili و همکاران (2005) در مطالعه اثرات مهاری نمونه‌های عسل‌های مختلف از کشور ترکیه به این نتیجه رسیدند که نمونه‌های عسل با توجه به منشاء گیاهی مختلف فعالیت مهاری متنوعی را نشان می‌دهند. Alzahrani و همکاران (2012) نیز در مطالعه خود تفاوت‌های فعالیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عسل‌های مختلف را مرتبط با تغییرات طبیعی در منشاء گل وگیاه و مکان‌های جغرافیایی عسل دانستند.

تفاوت در فعالیت ضدمیکروبی نمونه‌های عسل به دلیل تغییرات در میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و فاکتورهای غیر پراکسیدی همچون ترکیبات فنلی شامل مشتقات سینامیک اسید است که میزان این فاکتورهای پراکسیدی و غیر پراکسید به‌طور اساسی به منشاء گیاهی و گرده گل نمونه عسل مرتبط است (Allen *et al*., 1991; Hamouda and Marzouk, 2011).

به‌طور کلی گونه‌های مختلف گیاه و گرده گل که زنبور عسل از آنها جهت شهد استفاده می‌کند با توجه به شرایط آب و هوایی، ترکیبات خاک و منطقه جغرافیایی منطقه متفاوت است و عسل حاصل از آنها یکسان نخواهد بود لذا اثرات بیولوژیک آنها نیز تحت تاثیر این شرایط متفاوت خواهد بود.

جدول2-کمترین غلظت مهارکنندگی(MIC) و کمترین غلظت باکتری‌کشی (MBC) هر یک از نمونه‌های عسل

نمونه عسل	آویشن		شوید		زول		پونه	
نام باکتری	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
شیگلا دیسانتری	15%	15%	15%	25%	6/25%	10%	10%	12/5%
استافیلوکوکوس اورئوس	12/5%	15%	12/5%	25%	10%	10%	12/5%	12/5%
باسیلوس سرئوس	15%	25%	12/5%	25%	10%	10%	25%	25%
اشریشیا کلی	25 %	50%	30%	30%	25%	25٪	50٪	50%

خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه‌های عسل

کیفیت عسل تولید شده توسط زنبوردار بستگی به تعدادی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی همچون میزان رطوبت، محتوای خاکستر، pH، اسیدیته، میزان قندهای احیاءکننده و... موجود در عسل دارد. به همین جهت استانداردهایی توسط کشورهای مختلف وضع شده است که عسل بایستی آن ویژگی‌ها را داشته باشد. در این ارتباط کمیسیون مواد غذایی کدکس و کمیسیون اروپا معیارهایی برای کنترل کیفیت عسل ارائه نموده اند.

رطوبت

نتیجه به‌دست آمده از آزمایشات فیزیکوشیمیایی برای اندازه‌گیری میزان رطوبت نمونه‌های عسل در مطالعه حاضر نشان داد که میزان رطوبت عسل‌های مورد آزمون در محدوده 25/36- 22/56 بوده است و عسل شوید بیشترین میزان رطوبت را نسبت به سایر عسل‌های مورد آزمون داشت (جدول3). مطالعات مشابه درصد رطوبت نمونه‌های مختلف عسل را در محدوده نمونه‌های مطالعه حاضر گزارش نموده‌اند (Iftikhar *et al*., 2011; Akram *et al*., 2014). رطوبت بالا در عسل به میزان رطوبت زمان تولید عسل بستگی دارد. همچنین محتویات آب به عواملی همچون دمای کندو و عوامل استخراج در عسل بستگی دارد (Molan, 2002).

خاکستر

نتیجه به‌دست آمده از اندازه‌گیری محتوای خاکستر نمونه‌های عسل نشان داد که عسل زول با 0/186 درصد بیشترین محتوای خاکستر را نسبت به سایر عسل‌های مورد آزمون به خود اختصاص داد (جدول3). مطالعات دیگر نتایج مشابه با محدوده محتوای خاکستر مطالعه حاضر گزارش کرده‌اند (Kamal *et al*., 2002; Aasima *et al*., 2008; Akram *et al*., 2014). خاکستر در واقع نشان‌دهنده تجزیه و تحلیل مواد معدنی در عسل است. مواد معدنی در عسل به نوع گیاه و نوع خاک بستگی دارد همچنین محتوای خاکستر به منشاء گل، میزان گرده گل و مواد جمع‌آوری شده توسط زنبور عسل مربوط می‌شود (Kamal *et al*., 2002). پایین بودن خاکستر نشانه گیاهی بودن و طبیعی بودن منشاء عسل است و عسل‌های شهد معمولا میزان خاکستر کمتری دارند (Bogdanov *et al*., 2002).

اسیدیته

عوامل مختلفی در میزان اسیدیته عسل دخیل هستند. اسیدیته آزاد در عسل به علت وجود اسیدهای آلی مثل اسید سیتریک، اسیدگلوکونیک، اسید استیک، اسید لاکتیک و اسید بوتیریک است. فراوان‌ترین اسید موجود در عسل اسید گلوکونیک می‌باشد که از تجزیه آنزیمی گلوکز توسط گلوکزاکسیداز تولید شده است. گلوکز اکسیداز آنزیمی است که به‌طور طبیعی در عسل یافت می‌شود (Oddo and Piro, 2004). اسیدیته نمونه‌های عسل مورد بررسی در محدوده 12/58-13/92 میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم است (جدول3). در حالیکه حداکثر مجاز استاندارد 40 میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم ارائه شده است (استاندارد ایران، شماره 92). مطالعات مشابه میانگین اسیدیته کمتر از حد مجاز را گزارش کرده‌اند (لکزاده و همکاران، 1392، کامکار و همکاران، 1391، جاهد وکامکار، 1384، Rouff *et al.*, 2007).

اسیدیته کمتر نمونه‌های عسل مورد بررسی در مطالعه حاضر در مقایسه با حداکثر مجاز استاندارد یعنی 40 میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم می‌تواند به این دلیل باشد که در این نمونه‌ها تخمیر ناخواسته در اثر رطوبت بالا که باعث افزایش اسیدیته می‌شود، اتفاق نیفتاده است.

جدول3- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نمونه‌های عسل مورد آزمون

نوع عسل	اسیدیته آزاد(meq/kg)	pH	رطوبت(درصد)	محتوای خاکستر(درصد)	میزان قندهای احیاء کننده(درصد)
شوید	13/92±0/29	4/15±0/015[c]	25/36±0/15[a]	0/114± 0[d]	63/8±0/1[a]
آویشن	12/58±0/87	4/26±0/015[a]	22/56±0/05[d]	0/147± 0/0005[b]	63/7± 0[a]
زول	13/18±1/14	4/19±0/011[bc]	24/03±0/05[b]	0/186± 0/0005[a]	63/7±0/26[a]
پونه	13/40±2/91	4/24±0/066[ab]	23/76±0/05[c]	0/121± 0/0005[c]	63/74±0/26[a]

حروف مشترک در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.

pH

pH عسل در محدوده اسیدی می‌باشد و استانداردهای جهانی pH عسل را بین 3/2 تا4/5 مجاز می‌دانند و حداقل pH مجاز برای عسل از سوی سازمان ملی استاندارد ایران 3/5 گزارش شده است. pH اسیدی عسل اساسا به دلیل حضور برخی از اسیدها از جمله گلوکونیک اسید که از تخریب گلوکز توسط گلوکزاکسیداز تولید می‌شود (Oddo and Piro., 2004). pH نمونه‌های عسل مورد آزمون در محدوده 4/15-4/26 و رابطه معکوس بین pH و اسیدیته عسل مشهود بود (جدول3).

قندهای احیا کننده

قندها از اجزای مهم عسل‌ها هستند که نقش مهمی را در تعیین خواص فیزیکی مانند تبلور، ویسکوزیته ایفا می‌کند. قندهای احیاءکننده در عسل گلوکز و فروکتوز هستند. میزان قند موجود در عسل بر ویژگی‌های بیولوژیک عسل تاثیرگذار است. ویژگی‌هایی مانند رطوبت عسل، انرژی‌زایی آن، مزه، کریستالی شدن، رنگ تحت تاثیر قند موجود در آن است. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران حداقل مقدار قندهای احیاءکننده را در عسل 65 گرم درصد مجاز می‌داند. میزان قندهای احیاء کننده در نمونه‌های عسل مورد آزمون در محدوده 63/7 -63/8 گرم درصد به‌دست آمد. مطالعات مشابه میزان قندهای احیاءکننده در نمونه‌های عسل را در محدوده مطالعه حاضر نشان دادند (Anupama *et al.*, 2003; Fahim *et al.*, 2014).

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج این مطالعه حاکی از اثرات ضدباکتریایی عسل‌های مورد آزمون بود و فعالیت ضدباکتریایی عسل با توجه به منشاء گیاهی آن متغیر است. فعالیت ضدباکتریایی عسل زول در مهار رشد باکتری‌های مورد آزمون قابل توجه بود. *شیگلا دیسانتری* حساس‌ترین باکتری و *اشرشیاکلی* مقاوم‌ترین باکتری مورد آزمون نسبت به نمونه‌های عسل در این تحقیق بودند. گونه‌های مختلف گیاه و گرده گل که زنبور عسل از آنها جهت شهد استفاده می‌کند با توجه به شرایط آب و هوایی، ترکیبات خاک و منطقه جغرافیایی منطقه متفاوت است و عسل حاصل از آنها یکسان نخواهد بود لذا اثرات بیولوژیک آنها نیز تحت تاثیر این شرایط متفاوت خواهد بود.

منابع

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. 1377. عسل، ویژگی ها و روش های آزمون. استاندارد ملی ایران، شماره 92، تجدیدنظر ششم.

Aasima, Z., Safdar, M.N., Siddiqui, N., Mumtaz, A., Hameed, T., &Sial, M.U., 2008, Chemical and analysis and sensory evaluation of branded honey collected from Islamabad and Rawalpindi market. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 21(1): 8691.

Akram, A., Sohail, A., Masud, T., Latif, A., Tariq, S., Butt, S.G., & Hassan, I., 2014, Physico-chemical and antimicrobial assessment of honey of *Apis dorsata* from different geographical regions of Pakistan. *International Journal of Agricultural Science Research*, 3(2): 025-030.

Allen, K.L., Molan, P.C.,& Reid, G.M., 1991, a survey of the antibacterial activity of some New Zealand honey. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43(12): 817-22.

Al-Waili, N.S., 2005, Mixture of honey, beeswax and olive oil inhibits growth of *Staphylococcus aureus* and *Candida* albicans. *Archives of Medical Research*, 36(1): 10-3.

Anupama, D., Bhat, K.K., & Sapna, V.K., 2003, Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. *Food Research International*, 36: 183–191.

Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin P., Ohe, W., Russmann, H., Vrowohl, G., Oddo,L., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Piro, R., Flamini, C., Morlot, M., Lheritier, J., Borrneck, R., Marioleas, P., Tsigouri, A., Kerkvliet, J., Ortiz, A., Ivanov, T., Darcy, B., Mossel, B. & Vit, P., 2002, Honey quality and International honey Commision.Virtural Beekeeping Gallery, Apicervices-Article. Honey quality. Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld, *Switzerland*. PP: l-3.

Boukraa, L., & Amara, K., 2008, Synergistic action of starch on the antibacterial activity of honey. *Journal of Medicinal Food*, 11(1): 195-198.

Ceyhan, N., & Ugur, A., 2001, Investigation of in vitro antimicrobial activity of honey. *Rivista di Biologia*. 94: 363–371.

Fahim, H., Dasti, G.I., Ali, I., Ahmed, S.,& Nadeem, M., 2014, Physico-chemical analysis and antimicrobial potential of *Apis dorsata*, *Apis melifera* and *ziziphus jujube* honey samples from Pakistan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(8): 633-641

Fidaleo, M., Zuorro, A., & Lavecchia, R., 2011, Antimicrobial activity of some Italian honeys against pathogenic bacteria. *Chemical Engineering Transactions*, 24: 1015-1020.

Franklin, R., Cockerill, I.I.I., Matthew, A., Wikler, M.B.A., FIDSA Jeff Alder,& Michael, N., 2012, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, M07-A9 32(2).

Guerrini, A., Bruni, R., Maietti, S., Poli, F., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Scalvenzi, L., & Sacchetti, G., 2009, Ecuadorian stingless bee (*Meliponinae*) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. *Food Chemistry*, 114:1413–1420.

Hamouda, H.M. & Marzouk, D.S., 2011, Antibacterial Activity of Egyptian Honey from Different Sources. International Journal of Microbiological Research, 2: 149-155.

Hegazi, A., Sherein, I., El-Moez, A.M., Abdou, A.,& Abd Allah, F., 2014, Antibacterial Activity of Some Types of Monofloral Honey against *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium perfringens*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(9): 552-565.

Iftikhar, F., Masood, M.A., & Waghchoure, E.S., 2011, Comparison of *Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea* and *Apis mellifera* from different areas of Pakistan. Asian Journal of Experimental Biological Sciences, 2(3): 399-403.

Jahed Khaniki, Gh.R.& Kamkar, A., 2005, A Survey of Physico-chemical Properties of Produced Honey in Garmsar City in 2003. *Journal of Food Science & Technology*, 1(4): 35-41

Kamal, A., Saeeda, R., Nouman, N., Tabassum, N., Musarrat, G., Qurehi, M., & Nasim, K., 2002, Comparative study of honey collected from different flora of Pakistan. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 2(9): 626-627.

Kamkar, A., Jahed Khaniki, Gh.R.,& Golestani, M.A., & Zeyghami, M.M 2012, Evaluation of physico- chemical properties of distributed honeys in Tehran city. *Journal of Veterinary Research and Biological Products*, 25(2):10

Khairy, E.A., Hedia, R.H., Dorgham, S.M.,& Effat, M., 2013, Comparative studies on antimicrobial activities (AMA) of different types of honey using bacteria from animal origin. *International Journal of Microbiological Research*, 4(1): 50-5.

Lakzadeh, L., Gheisaria, H.R., & Mahianeh, A.H., 2013, Comparison microbial and physicochemical characterization of different origin plant honeys in Esfahan province. *Journal of Veterinary Research and Biological Products*, 26(3): 23-30

Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., & Henle, T., 2008, Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52: 483-489.

Molan, P.C., 2002, Re-introducing honey in the management of wounds and ulcers: theory and practice. *Ostomy Wound Manage*, 48: 28-40.

Moussa, A., Saad, A., Noureddine, D., Aboud, B., Meslem, A., & Baghdad, K., 2011, the influence of starch of ginger on the antibacterial activity of honey of different types from Algeria against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Microbiological Research*, 2(3): 258-262.

Nikaido, H., 2003, Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593-656.

Nzeako, B.C., & Hamdi, J., 2000, Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates. *Medical Sciences*, 2:

75–79.

Oddo, L.P., & Piro, R., 2004, Main European unifloral honeys: descriptive sheets. Apidologie, 35(1): S38S81.

Paulus, H., Kwakman, S., Sebastian, A & Zaat, J., 2012, Antibacterial Components of Honey. *IUBMB Life*, 64(1): 48–55.

Ruoff, K., Luginbühl, W., Bogdanov, S., Bosset, J.O. & Estermann, B., 2007, Quantitative determination of physical and chemical measurands in honey by near-infrared spectrometry. *European Food Research and Technology*, 225(3-4): 415-423.

Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman S., & Humphreys, H., 2010, Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1):47-52.

Standard No. 92, Honey, features and test methods, Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 6nd Ed., 2008.

Taormina, P.J., Niemira, B.A., & Bauchat, L.R., 2001, Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, 69: 217–225.

Tumin, N., Halim, N., Shahjahan, M., Noor Izani, N., Sattar, M.A., Khan, A.H., & Mohsin, S.S.J., 2005, Antibacterial activity of local Malaysian honey. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(2): 1-10.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 2, June. July. 2018, p. 273- 282

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 2، خرداد- تیر 1397، ص. 282-273

Antibacterial activity and physico-chemical analysis of several types of honey with different floral origins in the Golestan province

S. Hizomi Shirejini[1], H. Koohsari[2*], S.Z. Seyyed Alangi[3]

Received: 2017.01.13
Accepted: 2017.06.24

Introduction: Study in order to introduce new antimicrobial agents with natural origin to prevent the antibiotic resistance and eliminating its effects, employing chemical agents is an indispensable necessity. Honey, as an important food with natural origin has high antimicrobial potential. Several factors have contributed to the antibacterial activity of honey. For example, acidity, osmolarity, hydrogen peroxide, phenolic and flavonoid compounds, including these factors. Also, small amounts of glucose oxidase, protease, amylase, catalase and phosphatase enzymes and chemical compounds such as methylglyoxal are also effective. Floral origin of honey is effective on its biological properties including antimicrobial, anti-tumor, anti-inflammatory, antioxidant and antiviral activity. So this study was done to evaluate the antibacterial activity and physico-chemical analysis of four types of honey with different floral origin including: *Thyme*, *Eryngium*, *Pennyroyal* and *Dill* collected from the bee hives in Golestan province.

Materials and methods: Four honey samples with different floral origin including, *Thyme*, *Eryngium*, *Pennyroyal* and *Dill* were collected from the bee hive in the Golestan province in north of Iran. The bacterial strains used in this study, including two species of gram-negative of *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* and the two species of gram-positive of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were provided in lyophilized. Bacterial strains in BHI broth were activated and from each of them were prepared bacterial suspensions equivalent to the McFarland 0.5 turbidity standard (1.5×10^8 CFU/ml). Evaluation of antibacterial activity using agar well diffusion method was performed. For this purpose serial dilutions of honey samples were prepared aseptically in sterilized distilled water. Surface of Mueller Hinton agar were uniformly inoculated with bacterial suspension containing of 1.5×10^8 CFU/ml. Then wells of 8 mm in diameter were prepared and these wells were filled with different dilutions of honey samples. After incubation at 37°C for 24 h, antibacterial activity was analyzed by measuring the zones of inhibition. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of honey samples were determined by using broth macro-dilution method. For this purpose, each of the tubes from different dilutions of honey samples were added by 5×10^5 CFU/ml from each of the tested bacteria and incubated for 24 h at 37°C. The results for microbial turbidity of visible were recorded. The last dilution (lowest concentration) in which microbial turbidity was not observed, as the MIC was considered. For the determination of MBC, from the tube that contained honey concentrations higher than the MIC were cultured onto the agar medium. The MBC was defined as the lowest concentration that allowed no visible growth on the agar. Also the studied physico-chemical properties were moisture content, pH, acidity, ash content and reducing sugars that was performed according to the Iranian National Standard No. 92.

Results and Discussion: The results indicated that the antibacterial effects of the tested honeys, and the difference between floral origins honeys is effective in antibacterial properties. MIC and MBC values obtained for the tested honeys were in the range of %6.25-50% (vol/vol). Highest antibacterial activity was recorded for *Eryngium* honey by agar well diffusion method with zone of inhibition of 15.5, 14,11 and 11 mm against *S. dysenteriae*, *S. aureus*, *B. cereus* and *E. coli* at concentration of 50% v/v respectively and its MIC for this bacteria were, 6.25%, 10%, 10% and 25% respectively. also low antibacterial activity of *Pennyroyal* honey was

1. Graduated student, Department of Food Science and technology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Golestan province, Iran
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Golestan province, Iran
3. Associate Professor, Department of Chemistry, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Golestan province, Iran
(Corresponding Author Email: hadikoohsari@yahoo.com)

confirmed so that MIC of the this honey for *E. coli, S. aureus, B. cereus* and *S.dysenteriae* was, 50%, 25%, 12.5% and 10%, respectively. The quality of honey depends on a number of physico-chemical properties such as moisture, ash content, pH, acidity, the amount of sugars. For this reason, standards for honey have been set by different countries. The physico-chemical analysis of honeys showed moisture contents in the range of 22.56-25.36%, acidity in the range of 12.58-13.59 meq/kg, pH in the range of 4.15-4.26, reducing sugars in the range of 63.7-63.8%. Also the ash content of *Eryngium* honey with 0.183% was higher than the other honey samples. This higher level might be due to the higher pollen count in this region. High ash contents may also depend upon the floral origin of honey and the material collected by bees during foraging. The low acidity of honey samples studied in the present study was due to the fact that there was no unwanted fermentation in these samples. Overall, the results implied that honey samples with different floral origin collected from the bee hive in the Golestan province in north of Iran have variable potential antibacterial activity. The variety of antibacterial effects of different types of honey can be due to differences in plants that honey is obtained from. In other words, different species of plants in different regions have different compounds and their obtained honey will not be the similar and thus its biological effects also will be different.

Keywords: Honey, Antibacterial activity, Physico-chemical properties, Floral origin